

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NADIA DE CESAR SANKIO

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE ESTRESSE EM TILÁPIAS
TRANSPORTADAS EM AGUA COM ADITIVOS ELETROLÍTICOS**

PONTAL DO PARANÁ

2015

NADIA DE CESAR SANKIO

RESPOSTAS METABÓLICAS DE ESTRESSE EM TILÁPIAS
TRANSPORTADAS EM AGUA COM ADITIVOS ELETROLÍTICOS.

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do curso superior de Tecnologia em Aquicultura, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Terra.

Orientador: Dr^o Fabiano Bendhack.

PONTAL DO PARANÁ

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR
Campus Pontal do Paraná



TERMO DE APROVAÇÃO

Nadia De Cesar Sankio

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE ESTRESSE EM TILÁPIAS
TRANSPORTADAS EM ÁGUA COM ADITIVOS ELETROLÍTICOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Aquicultura, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Fabiano Berdhack
Orientador e Presidente

Dr. Alexandre Sachsida Garcia
Membro Examinador

Dr. Luciene Correa Lima
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 16/12/15.

À meu pai Paulo e minha mãe Eliete, que sempre me incentivaram e me apoiaram para que eu fosse em busca dos meus sonhos e me deram forças para não desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Pesquisas em Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), em especial a Dra. Ana Paula Baldan, possibilitando a execução deste estudo, disponibilizando a estrutura do laboratório para a realização do trabalho e as análises das amostras e seus ensinamentos. Obrigada.

A banca avaliadora, PhD. Alexandre Sachsida Garcia e Dra. Luciene Corrêa Lima por aceitarem o convite e contribuírem para a melhora deste trabalho. Obrigada.

Ao meu orientador professor Dr. Fabiano Bendhack pela oportunidade e confiança em realizar este trabalho, além do conhecimento compartilhado e a amizade. Muito obrigada.

À toda equipe do GEPeixe, Waleska, Ivan, Gabriel, Nice, que sempre estiveram presente me ajudando e apoiando. Os dias no laboratório não seriam tão alegres sem vocês.

A Nice e sua família que nesses quatro anos esteve sempre ao meu lado, me ajudando a enfrentar as dificuldades, me acolhendo, pela cumplicidade, sinceridade. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais Paulo e Eliete, que mesmo em alguns momentos estando distante não deixaram de acreditar em mim e me dar forças para seguir o meu caminho e buscar alcançar meus sonhos. Amo vocês

As minha irmãs Natália e Camila e a minha tia Marina, que estavam ao meu lado, sempre incentivando mesmo quando as coisas estavam difíceis. Obrigada meninas, amo vocês.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

O transporte é uma importante etapa na piscicultura, onde usualmente se acrescentam substâncias como sais e tamponantes para amenizar o estresse e aumentar as densidades de animais para otimização do processo. Essas substâncias tem a função de facilitar o retorno a homeostase dos peixes, abalada pela manipulação e confinamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar respostas metabólicas indicadoras de estresse em tilápias transportadas com diferentes compostos eletrolítico dissolvidos na água. Os peixes oriundos de reprodução natural em viveiros, tinham peso médio de $208,3 \pm 80,8$ g e comprimento padrão médio de $18,4 \pm 2,6$ cm. Os peixes foram mantidos em viveiros escavados de concreto e submetidos a jejum por 24 horas previamente ao início do transporte. A despesca foi realizada em duas etapas, sendo a primeira de forma rápida de oito peixes para estimar os valores basais dos indicadores estudados, em seguida foram capturados os peixes submetidos ao transporte. O transporte foi realizado durante quatro horas pela região de São José dos Pinhais-PR, em uma caminhonete portando 16 unidades de transporte (18 L cada) em densidade de 173 g L^{-1} , abastecidas por sistema de oxigênio pressurizado, distribuído por mangueiras microperfuradas. Foram testados quatro tratamentos com quatro repetições que foram os seguintes: controle (sem aditivos), NaCl (4 g L^{-1}), aditivo iônico formulado e aditivo iônico formulado + NaCl (4 g L^{-1}). Para as amostragens antes e após o transporte, os peixes foram anestesiados com benzocaína (10 mg.L^{-1}), e o sangue coletado por punção da veia caudal. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise de cortisol, glicose plasmática e íons. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, as médias foram submetidas à ANOVA e quando apresentadas diferenças, comparadas pelo teste T. O cortisol circulante dos peixes do grupo controle ($134,93 \text{ ug dL}^{-1}$) se elevou significativamente quando comparados com os peixes dos demais tratamentos e também com os peixes que não foram transportados, entre os tratamentos testados não houve diferenças significativas para o cortisol. A glicose plasmática dos peixes do tratamento com aditivo + NaCl ($88,92 \text{ mg dL}^{-1}$) foi menor que nos demais tratamentos e ainda maior que os valores basais ($34,38 \text{ mg dL}^{-1}$) encontrados. Para os valores de cálcio sérico e potássio sérico não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, para o sódio sérico verificamos uma diminuição entre o tratamento basal ($147,285 \text{ mmolL}$) e o tratamento com aditivo ($141,6 \text{ mmolL}$), o que pode estar relacionado com a ausência do NaCl. Levando a concluir que a fórmula testada apresentou o mesmo efeito de mitigação do estresse já conhecido do NaCl e quando utilizada em conjunto com o NaCl apresentou menor demanda energética para a manutenção da homeostase.

Palavras- Chave: Transporte. Peixe vivo. Cortisol.

ABSTRACT

Transportation in fish-farming is an important stage in which usually substances, such as salts and buffers, are added to ease the stress and to raise the fishes density aiming an optimization of the process. These substances are used to facilitate fishes' homeostasis returning process, which had been disturbed due to handling and confinement. This research objective was to rate the metabolic answers that indicate stress in *tilapia* transported into different substances dissolved in water. Fishes native from natural reproduction in farm, with an average weight of $208,3 \pm 80,8$ g and a standard length of $18,4 \pm 2,6$ cm. The fishes were held into excavated pools and submitted to food fasting for 24 hours prior to the beginning of the transportation. The fish removal happened into two stages, being the first one fast with eight fishes to estimate the baseline indicators, and the second after this, when the transported fishes were caught. The transportation was realized for four hours through São José dos Pinhais-PR region, by a pickup carrying the 16 transport units (18L) into a 173 g L^{-1} density, stocked by a pressurized oxygen system, distributed through microperforated hoses. Four treatments with four repetitions were tested during the transportation: control (without additions), $\text{NaCl } 4\text{g L}^{-1}$, ionic addition formulated and ionic addition formulated plus $\text{NaCl } (4\text{g L}^{-1})$. For sampling, before and after the transportation, the fishes were anesthetized with benzocaine (10mg L^{-1}), and the blood sampled through tail vein's puncture. The samples were stored at -20°C degrees to a posterior cortisol and plasma glucose analyzes. The experimental design was randomized, the averages were submitted to ANOVA and when differences were shown, they were compared by the T test. The fishes current cortisol of the control group ($134,93 \mu\text{g dL}^{-1}$) raised significantly when compared to the fishes from the treatments and also with the not transported fishes, among the tested substances. Among the tested substances had no significant difference to this index. Fishes' plasma glucose from the treatment with addition plus $\text{NaCl } (88,92 \text{ mg dL}^{-1})$ was smaller than into the other treatments and even bigger than the baseline ($34,38 \text{ mg dL}^{-1}$) tested, leading to the conclusion that the tested formula presented the same stress mitigation effect already known when NaCl is used. Furthermore when the formula was used together with NaCl it presented a smaller energy demand to the homeostasis maintenance.

Keyword: Transport; Live fish; Cortisol

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS..... | 15 |
| 2.1 Objetivos gerais | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos | 15 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1 Protocolo experimental | 16 |
| 3.2 Coletas e análise laboratorial..... | 17 |
| 3.3 Estatística..... | 19 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1 Qualidade da água | 20 |
| 4.2 Cortisol sérico..... | 20 |
| 4.3 Glicose plasmática | 21 |
| 4.4 Sódio sérico | 22 |
| 4.6 Cálcio sérico | 24 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 25 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

A tilapia (*Oreochromis niloticus*) destaca-se na aqüicultura mundial, sendo atualmente o cultivo mais generalizado, por apresentar crescimento rápido e rusticidade (FAO, 2014) além de possuir técnicas de reprodução e larvicultura dominadas, carne de ampla aceitação e valorizada no mercado consumidor (HILDSORF, 1995).

O transporte de peixes é uma etapa fundamental na atividade aquícola, pois pode ser preciso para manejo na própria piscicultura ou para levar a locais distantes, como por exemplo, pisciculturas de engorda ou pesque pagues. O transporte envolve um volume grande de água e uma alta densidade de peixes, pois para o transportador é mais lucrativo quando a densidade de estocagem for alta.

O transporte ocasiona uma série de situações estressantes, como a captura, o carregamento nas caixas de transporte, o transporte propriamente dito, o descarregamento e a estocagem dos peixes nos viveiros (KUBITZA, 1997). Quando os animais encontram-se estressados tornam-se mais vulneráveis a possíveis agentes infecciosos, podendo espalhar estes agentes para os outros peixes ou chegar a óbito. Fatores estressantes são responsáveis por grandes prejuízos em pisciculturas, pois afetam o metabolismo animal, conseqüentemente e o ganho de peso e crescimento e outros parâmetros zootécnicos (OBA et al., 2009).

Durante o transporte, os peixes passam por diversas alterações hormonais, metabólicas, hematológicas de desequilíbrio hidroeletrolítico e de suscetibilidade a patógenos, que caracterizam respostas primárias e secundárias após ação do agente estressor (BARTON E IWAMA, 1991; URBINATI E CARNEIRO, 2004; GOMES et al, 2003; BRANDÃO et al 2006; OLIVEIRA et al, 2010).

O manejo de captura e transporte fazem com que ocorram reações fisiológicas nos peixes, sendo a liberação de cortisol, de adrenalina e alterações secundárias, o que causa a mobilização dos estoques energéticos,

aumento da atividade muscular e alterações no balanço ácido-base, em síntese.

O jejum é considerado um fator importante que antecede o manejo de captura e transporte, sendo recomendado interromper a alimentação dos peixes no mínimo um dia antes do manejo (MIKOS, 2011). O jejum é relevante para que não haja demanda extra de oxigênio, devido ao material fecal acumulado as unidades de transporte, o que implica em um aumento de organismos patogênicos e metabolitos tóxicos na água. Além disso, os peixes submetidos ao jejum se recuperam mais rapidamente do estresse da despesca, carregamento e transporte (KUBITZA 1997).

Na captura, os peixes tem um maior gasto de energia para tentativas de fuga, por isso utilizam energia extra-alimentar, já que estão em jejum. Deve-se fazer a captura com cuidado e evitar o manuseio exagerado dos animais para evitar lesões e a perda do muco. O muco atua como uma barreira de proteção contra agentes externos, patógenos do ambiente e garante a relação de simbiose entre o peixe e os microorganismos (URBINATI E CARNEIRO, 2004).

Devido a necessidade de transporte e manejo a alta densidade, que muitas vezes são praticadas, qualidade da água e a flutuações, entre outros fatores, o estresse sempre estará presente em pisciculturas. Uma maneira comumente usada para minimizar o efeito de agente estressor durante os manejos de captura e transporte é o uso de aditivos, como sulfato de cálcio, na água de transporte. (CARNEIRO E URBINATI, 2001; GOMES et al 2003; GOMES et al 2006; URBINATI E CARNEIRO, 2006).

O uso de substâncias redutoras de estresse e mortalidade é amplamente utilizado na piscicultura (WEDEMEYER, 1981; GOMES, et al., 2003; PEÇANHA E GOMES, 2005), pois possibilitam a concentração de sais do meio semelhante às do sangue, facilitando a regulação osmótica e estimulam a produção de muco (WURTS,1995; SOARES & ARAÚJO-LIMA, 2003).

O estresse pode ser definido como a situação em que o organismo sai do seu estado de homeostase (CARNEIRO E URBINATI, 2001; BENDHACK, 2008). Para voltar ao equilíbrio, os peixes aumentam o movimento opercular, o que aumentará a quantidade de água, junto com os sais, que entra no organismo e os sais que se perdem para a água, o que acarretará uma

elevação na taxa de absorção do oxigênio e auxiliará na respiração. Quando o peixe está com seu meio interno em equilíbrio com o ambiente, diz-se que está em homeostase.

As respostas ao estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (MAZEAUD et al., 1977; WEDEMEYER & MCLEAY, 1981). A primária representa respostas hormonais, a secundária traz mudanças nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos enquanto a resposta terciária provoca mudança no crescimento e comportamento dos peixes, o que os deixam mais suscetíveis a doenças. Os indicadores mais utilizados na avaliação do estresse são a glicose e o cortisol plasmáticos (ROBERTSON et al., 1987; BARTON, 2000). O cortisol é utilizado para caracterizar a resposta primária, e a glicose, a resposta secundária (GOMES et al., 2003) .

O cortisol, principal corticosteróide em peixes, é considerado um bom indicador para avaliação do estresse primário e seus resultados podem ser facilmente comparados com outras espécies (MIKOS, 2011). As principais ações do cortisol sobre o metabolismo são a estimulação das enzimas transmissoras envolvidas na gliconeogênese hepática, o bloqueio da assimilação da glicose pela musculatura lisa e pelo tecido adiposo, a diminuição da síntese protéica e o aumento da proteólise (BARTON E IWANA, 1991).

A glicose é o principal monossacarídeo circulante que atua como substrato energético, armazenado como glicogênio hepático e muscular (por meio da glicogênese), mobilizando para proporcionar suporte energético aos peixes (WENDELAAR BONGA 1997; OLIVEIRA et al 2010).

A glicemia é um bom indicador para respostas secundárias do estresse, pois esta avaliação pode ser realizada no ambiente produtivo, com medidores simples e facilmente encontrados no mercado (BRANDÃO et al 2006).

A hiperglicemia relacionada ao estresse é relatada para várias espécies de peixes e também medida principalmente pelos efeitos das catecolaminas, levando à liberação de glicose hepática, sendo o principal carboidrato de reserva do peixe, embora não seja o principal substrato de reserva (lipídios) (LIMA et al 2006). Sob condições de estresse essas reservas energéticas são utilizadas para atender necessidades extras.

As quantidades de glicogênio armazenadas no fígado e a capacidade de mobilização destas reservas energéticas, variam entre as espécies de peixes, quando submetidos a períodos de jejum (BARTON E IWANA 1991; ENES et al 2009; OLIVEIRA et al 2010)

As respostas de estresse agudas (primárias) e as “crônicas” (secundárias) envolvem respostas fisiológicas controladas e comportamentais, pelo sistema neuro-endócrino, com o sistema simpático – cromafim e o eixo hipotálamo-pituitara –interrenal como dois componentes importantes.

Na resposta primária, segundos após o estímulo estressor, o sistema nervoso simpático estimula diretamente as células cromafins, que liberam catecolaminas (especialmente adrenalina), com função de aumentar os batimentos operculares, estimular o fluxo de sangue nas brânquias e de aumentar a capacidade de transporte (FABRI et al 1998) o que disponibiliza rapidamente a glicose. Ao mesmo tempo, a hipófise estimulada pela secreção de CRH (hormônios liberadores de corticotrofina) do hipotálamo, libera ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) na corrente sanguínea, que por sua vez, provoca a liberação do cortisol nas células secretoras do rim cefálico (BARTON E IWAMA, 1991). Nessas condições, a hiperglicemia, induzida inicialmente pelas catecolaminas, é resultante de glicogenólise hepática (MIKOS, 2011) que resulta no aumento da concentração plasmática de cortisol sendo esta uma importante resposta secundária ao estresse (MOMMSEN et al 1999).

A concentração de sais encontrada no sangue de peixes de água doce é cem vezes maior que a encontrada na água. A constante entrada de água e a perda de íons como Na^+ e Ca^{2+} são compensados através da excreção de grandes volumes de urina diluída e captação dos íons perdidos por mecanismo ativo das células de cloreto (BENDHACK, 2004).

A diminuição do gradiente pode reduzir o impacto dos estressores (BENDHACK, 2004), como demonstrado em Gomes et al (2003) e Carneiro e Urbinati (2001) onde utilizaram uma concentração de sal (NaCl) na água de transporte semelhante as concentrações plasmáticas em peixes tropicais. O cálcio na água reduz a permeabilidade das membranas e junções celulares, controlando a perda de íons nos momentos de estresse (MCDONALD e ROBINSON, 1993).

Todos esses processos realizados durante a fase secundária de resposta ao estresse buscando equilíbrio salino e a homeostase, são adaptativos ao estresse e gastam muita energia. Quando o peixe não consegue se adaptar ao estímulo do estressor e este ainda continua a agir sobre o animal, suas reservas de energia se esgotam e então ele precisa se render, é onde começa a fase terciária (CORDEIRO 2012).

Diversas formas para reduzir o estresse no transporte dos peixes vem sendo estudadas. A mais comum delas é a adição de cloreto de sódio (NaCl) na água do transporte, pois o sal diminui a diferença osmótica entre o plasma do peixe e o ambiente, fazendo com que os mesmos liberem menos amônia e CO₂, além de causar uma diminuição no consumo de O₂, minimizando assim a degradação da qualidade da água (KUBITZA, 1997; SILVEIRA et al., 2009), porém o uso do sal causa uma corrosão nas estruturas de transporte.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo comparar uma fórmula sem a adição de NaCl com fórmulas usuais para a redução do estresse e seus efeitos em tilápias transportadas vivas.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar concentrações de indicadores bioquímicos de estresse em tilápias como: cortisol, glicose, potássio, sódio e cálcio sanguíneos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Foram utilizadas tilápias com peso médio de 208,387g e comprimento padrão médio de 18,425cm. Os peixes foram acondicionados em três viveiros escavados (figura 1). A despesca foi realizada em duas etapas, sendo a primeira para retirar o grupo que seriam avaliados os valores “zero” (8 peixes), em seguida foi realizado a despesca para capturar o grupo que foi transportado. Os peixes foram sujeitos a 24 horas de jejum e acondicionados em 16 baldes de 18L de água com uma quantidade de 173 g L⁻¹ de peixe. O transporte foi realizado durante quatro horas na região de São José dos Pinhais – PR, em uma caminhonete portando os 16 baldes (figura 2), utilizando um cilindro de oxigênio e mangueiras perfuradas para manter os níveis durante o transporte.

Foram testados quatro tratamentos. Com quatro repetições cada, durante o transporte: Apenas água (grupo controle), sal NaCl (4g/L), aditivo iônico formulado e aditivo iônico mais sal NaCl (4g/L).

No aditivo iônico formulado continha cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl) e bicarbonato de sódio (NaHCo₃).



Figura 1 Despesca, em viveiro escavado



Figura 2 Caminhonete, com os 16 baldes de transporte, mangueiras de oxigênio e cilindro de oxigênio

3.2 Coletas e análise laboratorial

Inicialmente, foi feita a coleta de sangue de oito peixes, anestesiados, para quantificação dos valores basais, após as quatro horas de transporte foi realizado a coleta de dois peixes por balde, totalizando oito por tratamento.

Os peixes foram capturados e anestesiados com benzocaína (1g para 10 litros de água) imediatamente antes das coletas de sangue feitas por punção caudal (figura 3) e aliqüotadas em dois tubos plásticos de 1,5 ml (figura 4), um tubo contendo anticoagulante para a análise de glicose e outro sem para separação do soro e posterior análise de cortisol e íons. As amostras foram armazenadas em -20°C para posterior análise.

Para a análise de glicose (figura 5) foi utilizado Kit de glicose monoreagente K082 (Bioclin, QUIBASA QUIMICA BÁSICA LTDA, MG, Brasil).

Para análise de cortisol foi utilizado o método de Elisa imunoenensaio enzimático por competição – Kit DRG cortisol Elisa .

Para as análises de íons (sódio, potássio e cálcio) usou-se máquina de eletrodo seletivo de íons da marca Drake.

Durante o período de transporte foram realizadas coletas de amostras de água sendo armazenadas em frascos plásticos, para analises de amônia, s em tempos diferentes (antes do carregamento, 15 minutos, 2 e, 4 horas após o transporte), iniciando no viveiro e com termino no seu destino. Junto com as

coletas de água foram realizadas análises de oxigênio e temperatura utilizando o oxímetro YSI 55 e pH utilizando peagâmetro YSI modelo 100 portátil. Para mensurar a amônia total foi utilizado o Reagente de Nessler.



Figura 3 Retirada de sangue por punção caudal



Figura 4 Aliquotagem de sangue em dois tubos plásticos de 1,5 ml, um contendo anticoagulante, outro sem



Figura 5 Material para a análise de glicose

3.3 Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e quatro repetições. Os dados coletados foram analisados quanto a normalidade, posteriormente foi realizada a análise da variância (ANOVA) e, quando as médias apresentarem diferenças significativas ($P < 0,05$) foram submetidas ao teste de Tukey para comparação.

4. RESULTADOS

4.1 Qualidade da água

Os parâmetros de qualidade de água analisados foram: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e concentração de amônia. Os valores médios \pm desvio padrão estão apresentados na Tabela 1. Os valores de oxigênio dissolvido, pH e temperatura ficaram dentro dos valores considerados apropriados para a espécie, a amônia ficou com um valor elevado devido a elevada densidade utilizada, simulando uma situação comercial real.

Tabela 1 Média e desvio padrão em cada tempo (viveiro, 0,15,120,240 minutos) do parâmetros físico-químicos da água de transporte da *Oreochromis niloticus*, durante 4 horas

| Tempos | Temperatura (°C) | O.D. (mgL⁻¹) | pH | Concentração Amônia (mgL⁻¹) |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------|---|
| Zero | 23,7 \pm 0,1 | 4,1 \pm 0,8 | 6,8 \pm 0,1 | 0,8 \pm 0,3 |
| Pré transporte | 22,1 \pm 0,1 | 6,4 \pm 0,2 | 7,6 \pm 0,1 | 0,0 \pm 0,0 |
| 15 minutos | 22,1 \pm 0,0 | 9,3 \pm 4,4 | 6,8 \pm 0,2 | 1,5 \pm 0,2 |
| 2 horas | 24,1 \pm 0,3 | 14,0 \pm 3,8 | 6,9 \pm 0,2 | 5,6 \pm 1,6 |
| 4 horas | 24,8 \pm 0,3 | 9,7 \pm 5,6 | 6,9 \pm 0,2 | 11,5 \pm 2,5 |

4.2 Cortisol sérico

O cortisol circulante dos peixes do grupo controle, se elevou significativamente (134,93 ng mL⁻¹), quando comparados com os peixes dos demais tratamentos e também com os peixes que não foram transportados. Entre as substâncias testadas não houve diferenças significativas para cortisol, como se observa na figura 6.

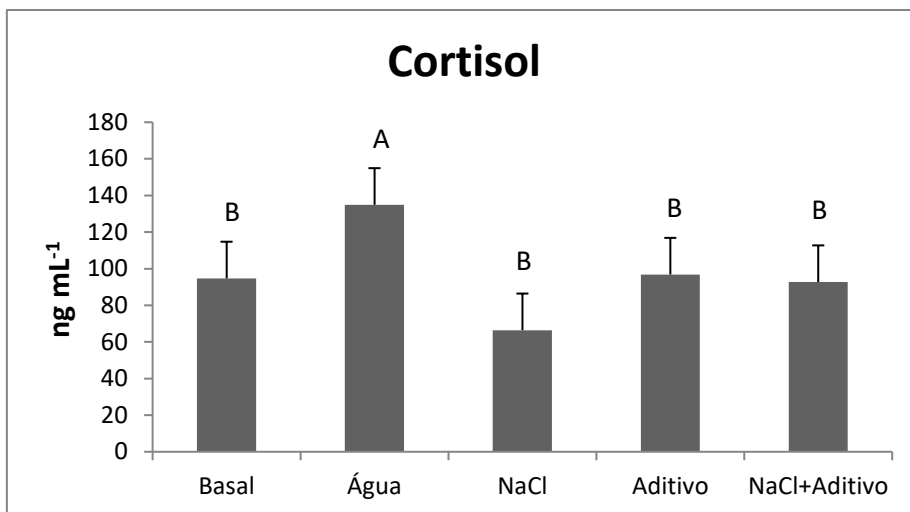


Figura 6 Valores médios de cortisol sérico (ng mL⁻¹) em *Oreochromis niloticus*, capturados e transportadas em tratamentos diferentes. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras diferentes sobre as barras indicam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.3 Glicose plasmática

A glicose plasmática dos peixes do tratamento com aditivo + NaCl foi menor que nos demais tratamentos (88,92 mg dL⁻¹) porém observamos que é mais elevado que os valores basais (34,38 mg dL⁻¹) encontrados, o que sugere que a fórmula testada apresentou o mesmo efeito de mitigação do estresse já conhecido do NaCl e, quando utilizada em conjunto com o NaCl, apresentou menor demanda energética para a manutenção da homeostase (figura 7).

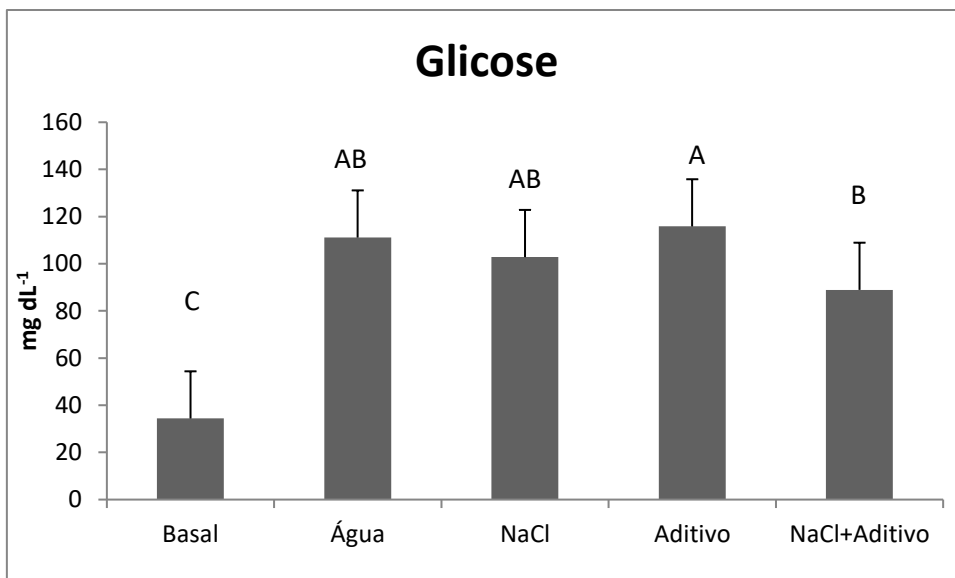


Figura 7 Valores médios de glicose plasmática (mg dL⁻¹) presentes em *Oreochromis niloticus*, capturadas e transportadas em tratamentos diferentes. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras em cima das barras indicam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Tukey. (p<0,05)

4.4 Sódio sérico

Para o sódio sérico observamos o maior valor para o grupo zero (147,285 mmol L⁻¹) não havendo diferença significativa quando comparado com o tratamento com adição de NaCl (143,625 mmol L⁻¹), já para os demais tratamentos, houve uma redução na concentração deste íon, água (142,25 mmol L⁻¹), aditivo (141,6 mmol L⁻¹) e NaCl + aditivo (143,375 mmol L⁻¹). Não houve diferença significativa entre os tratamentos e o tratamento NaCl (143,625 mmol L⁻¹) (figura 8).

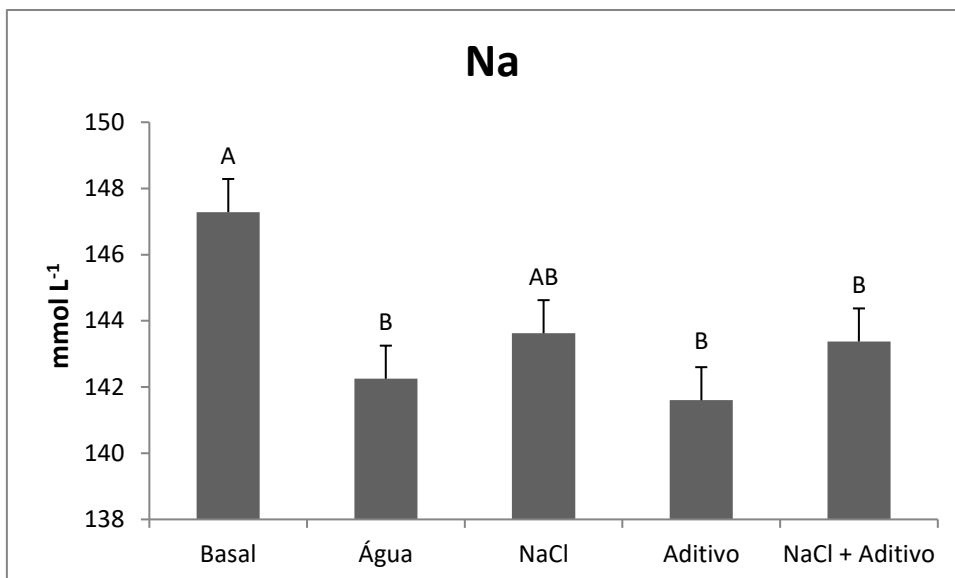


Figura 8 Valores médios de sódio sérico (mmol L⁻¹) de *Oreochromis niloticus*, capturadas e transportadas em tratamentos diferentes. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras em cima das barras indicam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.5 Potássio sérico

O potássio sérico apresentou um valor semelhante em todos os tratamentos avaliados (média 3,484 mmol L⁻¹), não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, como demonstra o gráfico da Figura 9.

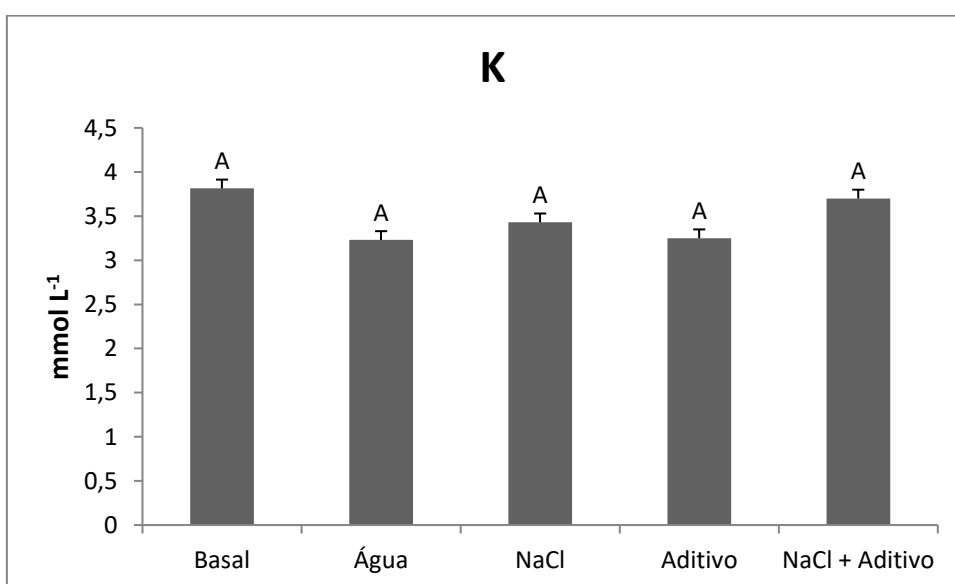


Figura 9 Valores médios de potássio sérico (mmol L⁻¹) de *Oreochromis niloticus*, capturadas e transportadas em tratamentos diferentes. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

Letras em cima das barras indicam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.6 Cálcio sérico

Para o cálcio sérico não houve diferença significativa entre os tratamentos (média 3,640 mg/dL), como vemos na figura 10.

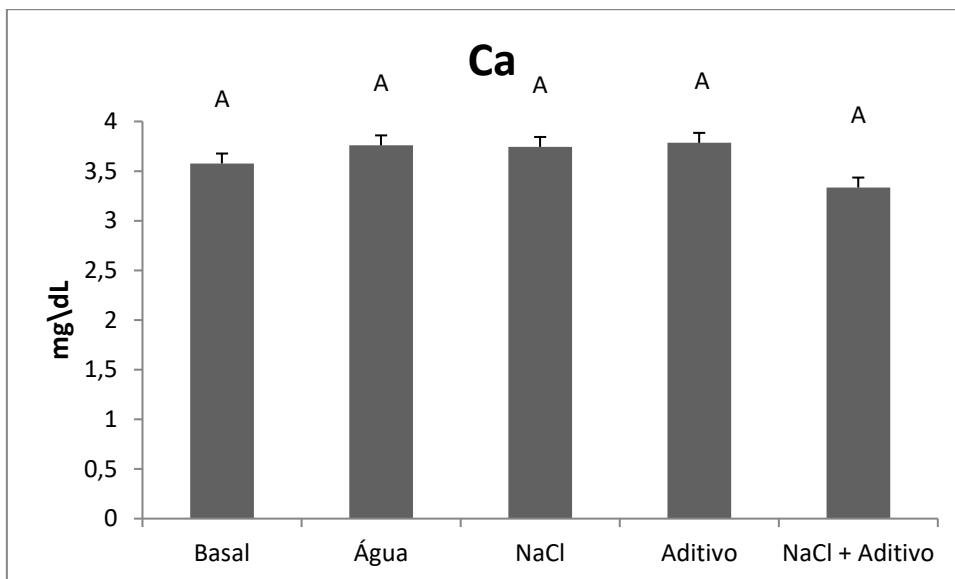


Figura 6 Valores médios de Cálcio sérico (mg/dL) presentes em *Oreochromis niloticus*, capturadas e transportadas em tratamentos diferentes. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras em cima das barras indicam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Os parâmetros de oxigênio e pH estão dentro do aceito como ideal para peixes, como citado por KUBITIZA (1997) que afirma que valores acima de 4mg de O₂L e pH próximos à 7 são ideais para a maioria dos peixes, assim como encontrado em MIKOS (2011) que obteve os valores de 8,3 ±3 mg O₂L e pH com valor médio de 7,9, nossos valores de oxigênio dissolvido não alterou pois estava sendo disponibilizado. A temperatura manteve-se próximo ao indicado para o transporte de peixes tropicais. Os valores de amônia encontrados foram elevados, o mesmo aconteceu no trabalho de SIMÃO (2009) onde foi encontrado o valor médio de 345,3 mmols\L para o tratamento de 50 alevinos por litro. Segundo BOYD (1990), o ideal para o cultivo de tilapia é 0,02 mmols\L, este fato pode ser explicado pela densidade que foi utilizada neste estudo serem próxima das comerciais.

Os arcos branquiais são constituídos por filamentos, estes são divididos em lamelas. Nestas lamelas ocorrem trocas gasosas e iônicas. O fluxo de água que irriga as brânquias corre no sentido inverso ao do sangue que passa pelas lamelas, maximizando os gradientes gasosos e osmóticos (BENDHACK, 2004). Assim há aumento do fluxo de íons para que os peixes consigam manter a homeostase. As funções das lamelas são: Trocas de gases (O₂, CO₂); atividade metabólica para a regulação osmótica; produção de uma fina camada de muco. Estas funções auxiliam no controle da perda de íons e ganho de água. Devido a hormônios que estão relacionados com o estresse, primeiramente cortisol e catecolaminas, essa estrutura branquial sofre modificações. Resultando em alterações na regulação ácido\base e na homeostase.

O maior valor de cortisol, foi para os peixes transportados sem nenhum tratamento (134,93 ng dL⁻¹). Entre o valor basal e os outros tratamentos não houve diferença significativa, mas observamos que no tratamento com NaCl (66,42 ng mL⁻¹) o cortisol foi menor que o encontrado no tratamento com o aditivo eletrolítico (96,839 ng mL⁻¹). Observamos em MIKOS (2011), onde tilapias foram submetidas ao transporte de três horas com diferentes concentrações de NaCl (0,0-0,9-1,2g\L) e o menor valor encontrado de cortisol

circulante, após o transporte, foi na concentração mais alta que utilizou. O uso de NaCl faz com que suprima a liberação do cortisol, o que reduz os níveis de glicose plasmática.

A hiperglicemia relatada em vários teleósteos em situação de estresse é fonte de energia para a reação conhecida como “luta e fuga” (WEDEMEYER *et al.*, 1990), em que o animal tenta enfrentar à condição estressora, e é atribuída principalmente ao efeito das catecolaminas (MAZEAUD E MAZEAUD, 1981; WENDELAARBONGA, 1997), que atuam diretamente no fígado e músculo esquelético provocando a quebra do glicogênio (FAGUNDES, 2005). Secundariamente, ela é mantida por ação do cortisol, por efeito gliconeogênico (MOMMSEN *et al.*, 1999). Este aumento, nos casos de estresse, tem origem glicogenolítica provavelmente da ação das catecolaminas e corticosteroides (MOMMSEN *et al.* 1999). OBA ET AL. (2009) explicam que o uso de NaCl ajuda a reduzir alterações fisiológicas do organismo, como hiperglicemia e hipercortisolemia.

No presente estudo, observamos que a glicose foi menor no tratamento com aditivo + NaCl (88,92 mg\dl) do que os outros tratamentos, apresentando o mesmo efeito de mitigação, conhecida do NaCl.

Em MIKOS (2011) não houve diferença significativa entre os tratamentos (sem transporte, 0,0% , 0,9%, 1,2% de NaCl), mas foi um valor de glicose mais alto do encontrado com o aditivo, observamos o mesmo efeito de mitigação de energia. O que podemos perceber foi que houve uma menor demanda energética para a manutenção da homeostase e que o aditivo ajuda o NaCl a diminuir essa demanda.

Para o sódio sérico observamos que os peixes do tratamento basal (147,285 mmol\L) apresentaram um valor maior que os peixes transportados. Para os peixes transportados com adição de NaCl (143,625 mmol\L) não houve diferença significativa com o tratamento basal. Mudanças na permeabilidade branquial por conta da secreção de catecolaminas, induzida pelo estresse, facilita a circulação de sódio e cloreto do plasma para a água, diminuindo a quantidade destes íons na circulação do peixe (BILLER *et al.*, 2008). Esta permeabilidade também pode ter sido intensificada pela diminuição do muco, o

qual serve como uma barreira fina de proteção entre o sangue do peixe e o ambiente externo contra a perda de íons, devido ao manuseio e captura com rede (WURTS, 2005; KUBITZA, 2007).

A concentração de potássio sérico teve valores aproximados em todos os tratamentos. O potássio sérico aumenta nos organismos mais estressados, já que as células sanguíneas apresentam uma membrana muito frágil e se rompem com facilidade, pelo distúrbio eletrolítico, ou seja, o líquido intracelular, extravasa para o plasma, (CARNEIRO E URBINATI, 2001). No estudo de GOMES ET AL (2008) com o transporte de alevinos de jundiá, os níveis corporais de Na e K não tiveram alterações mesmo transportadas na água sem adição de sal.

A concentração de cálcio sérico está intimamente ligada com a concentração do meio (FLIK & VERBOST, 1993) e com o nível de cortisol (EDDY, 1981; BENDHACK, 2004). Altas concentrações de cálcio na água, tendem a diminuir a permeabilidade iônica das brânquias, diminuindo a perda de íons, conseqüentemente, ocorrendo um melhor equilíbrio homeostático do animal (McDONALD & ROBINSON, 2011). Assim como o potássio sérico, para o cálcio não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, assim como para o transporte de matrinxãs, com adição de diferentes concentrações de sulfato de cálcio (BENDHACK, 2004).

6. CONCLUSÃO

Observamos que no transporte de tilápias, com os aditivos testados, houve melhores resultados para os níveis, de cortisol circulante, quando comparados ao transporte só com água. O aditivo formulado apresentou melhores resultados para o indicador glicose plasmática quando somados à adição de NaCl na água do transporte. Para o potássio sérico e o cálcio sérico não obtivemos diferença significativa. E para o sódio sérico houve uma diminuição na concentração plasmática dos peixes transportados no tratamento com a formula, o que pode estar relacionado com a ausência de NaCl. Desta forma, concluímos que a fórmula testada possui potencial para mitigação de estresse nesta espécie, necessitando avaliar outros indicadores complementares e situações mais extremas de transporte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, Vancouver, v.10, p.3-26, 1991.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 62, n. 2000.

BENDHACK, F. **Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de Matrinxãs *Brycon amazonicus***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura na área de Concentração de Aquicultura em Águas Continentais) – Centro de Aquicultura , Universidade Estadual Paulista, 2004.

BENDHACK, F. **Respostas fisiológicas do Matrinxã *Brycon amazonicus* após mudança de ambientes com diferentes concentrações de sais de cálcio e de sódio**. Tese (Doutorado em aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, 2008.

BILLER, J.F.; BENDHACK, F.; TAKAHASHI, L.S.;URBINATI,E.C. Stress responses in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to repeated air exposure. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.1, p.89-93, 2008.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1990. 482p.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; **Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura**. Acta Amaz. vol.36 no.3, Manaus, 2006.

CARNEIRO, P.F.C; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32,p. 297-304, 2001.

CORDEIRO, A. **Respostas fisiológicas do jundiá *Rhamdia quelen* ao estresse do transporte sob diferentes concentrações de cloreto de sódio na água.** Trabalho de graduação (Bacharel em Tecnologia em Aquicultura) Setor de Ciências da Terra, Pontal do Paraná, 2013.

EDDY, F.B. Effect sod stresse on osmotic and ionic regulation in fish. In: Pickering, A.D (ed) **Stress and fish**. Academic Press, London, p 77-102, 1981.

ENES, P; PANSERAT, P; KAUSHIKS; OLIVA_TELES, A. Nutritiond regulation of hepact glucose metabolism in fish. **Fish physiol Biochem**, v. 35, p 519-539, 2009.

FABBRI, E., CAPUZZO, A., Moon, T.W., 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 120, 177-192.

FAGUNDES, M., **RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*) A ESTRESSORES COMUNS NA PISCICULTURA** Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Area de concentração em aqüicultura em águas continentais – Universidade Estadual Paulista – Unesp – Jaboticabal, 2005.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Rome 2014.

FLIK, G.; VERBOST, P.M. Calcium transport in fish gills and intestine. **The Jornal of Experimental Biology**, v. 184, p.17-29, 1993.

GOMES, L.C.; ARAUJO- LIMA, C.A.R.M; ROUBACH,R.; CHIPARRI- GOMES, A.R., LOPES, N.P. ; URBINATI, E.C. Effect density during transportion on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossama macropomum*. **Journal of Aquiculture Society**,v.34, p 76-84, 2003.

GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; BRINN, R.P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C.E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation o air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v.256, p.521-528, 2006.

HILDSORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. **Boletim Instituto de Pesca**, v.22, n.1, p.73-78, 1995.

KUBITZA, F; Transportes de Peixes Vivos. **Panorama da Aquicultura**, v. 43, p.20- 26, 1997.

KUBITZA, F. A versatilidade do sal na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 103, p. 14- 23, 2007.

LIMA, L. C., RIBEIRO, L. P., LEITE, R. C., MELO, D. C. **Estresse em peixes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 30 (3-4), 113-117, 2006.

MAZEAUD, M.M; MAZEAUD, F. ; DONALDSON, E.M, Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

McDONALD, D.G.; ROBINSON, J. G. **Physiological Responses of Lake Trout to Stress: Effects of Water Hardness and Genotype**, Transactions of the American Fisheries Society, 122:6, 1146-1155, 1993.

MIKOS, J.D, **Efeito do transporte sobre o estresse e a qualidade da carne da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)** Tese (Mestrado em Ciência Animal) Setor Ciências Agrárias e Ambientais- Pontifícia Universidade Católica do Paraná – São Jose dos Pinhais, 2011.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.

OBA, E.T, MARIANO, W.S., ROMAGUEIRA, L., SANTOS, B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Manejo e Sanidade de peixes em Cultivo**, 8, 226-247, 2009.

OLIVEIRA, R. H. F; SILVA, E. M. P; BUENO, R.S; BARONE, A.A.C. O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v.40 p. 2562-2567, 2010.

PEÇANHA, M. F. & GOMES, L. C. A. (2005). **Eficácia do mentol como analgésico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*)**, [Monografia de conclusão do curso de Ciências biológicas], Manaus:ESBAM.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. **Progressive Fish-Culturist**, Binghamton, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1987 .

SANTOS,G.N, **Respostas fisiológicas do surubim do iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetido ao transporte com cloreto de sódio**\ Trabalho de graduação (Bacharel em Oceanografia) Setor de Ciências da Terra, Pontal do Paraná, 2013.

SILVEIRA, U.S; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C; Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n 4, p.1001-1017 Julho/Agosto, 2009.

SOARES, E. C. S.; LIMA, C. A. R. M. A. (2003). Influencia do Tipo do alimento e da temperatura na Evacuação Gástrica da Piranha caju (*Pygocentrus nattereri*). **Acta Amazonica**. 34 (1): 35-45.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In **Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical**. Cyrino, J.E.P.,Urbinati, E.C., Castagnolli, N. (Eds.). p. 171-193, 2004. Editora TecArt. SãoPaulo.

URBINATI, E.C; CARNEIRO, P.C.F, Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleost, characidae). *Acta Amazonica*, v. 36, n.4 p. 569-572, 2006.

WEDEMEYER, G. A.; McLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: **Academic**, 1981. p. 247-275.

WEDEMEYER, G.; BARTON, B.A.; McLEAY, D.J. **Stress and acclimation**. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda. 1990. p.451-489.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WOOD, C.M. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interaction, after exhaustive exercise in fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 160, p. 285-308, 1991.

WURTS, W. A. (1995). Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**. 26: 80-81.

XXIX ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO 29, 2009, Salvador, **Otimização da densidade de estocagem na logística de transporte de tilápias** , Salvador, Enegep, 2009.